



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 028 380** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) Int. Cl.⁶ **C 12 N 15/31, 9/14, C 12 P**
13/02, C 12 N 9/78

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 4895024/13, 27.02.1991

(30) Priority: 28.02.1990 JP 48079/90

(46) Date of publication: 09.02.1995

(71) Applicant:
Nitto Kemikal Indastriz Ko., Ltd. (JP),
Terukhiko Beppu (JP),
Khideaki Jamada (JP)

(72) Inventor: Terukhiko Beppu[JP],
Khideaki Jamada[JP], Toru
Nagasawa[JP], Suekharu Khorinouti[JP], Makato
Nisijama[JP]

(73) Proprietor:
Nitto Kemikal Indastriz Ko., Ltd. (JP),
Terukhiko Beppu (JP),
Khideaki Jamada (JP)

(54) NUCLEIC ACID FRAGMENT ENCODING POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, RECOMBINANT PLASMID DNA PPCL 4 ENCODING POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, STRAIN OF BACTERIUM ESCHERICHIA COLI - A PRODUCER OF POLYPEPTIDE SHOWING NITRILE HYDRATASE ACTIVITY, AND A METHOD OF NITRILE HYDRATASE PREPARING

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, genetic engineering. SUBSTANCE: DNA fragment encoding polypeptide showing nitrile hydratase activity is prepared from the bacterial cells *Pseudomonas chlororaphis* B23. This nitrile hydratase shows capability to hydrate nitriles to amides. Recombinant

DNA containing this gene and transformant formed by transformation of strain *E. coli* with recombinant DNA were prepared. Invention involves also a method of nitrile hydratase preparing using this transformant. EFFECT: preparing of DNA fragment indicated above. 5 cl, 10 dwg

RU 2 028 380 C1

RU 2 028 380 C1



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 028 380** ⁽¹³⁾ **C1**
(51) МПК⁶ **C 12 N 15/31, 9/14, C 12 P**
13/02, C 12 N 9/78

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 4895024/13, 27.02.1991
(30) Приоритет: 28.02.1990 JP 48079/90
(46) Дата публикации: 09.02.1995
(56) Ссылки: 1. Патент США N 4637982, кл. C 12P 13/02, 1987.2. Патент EP N 0243967, кл. C 12N 9/98, 1987.3. Патент EP N 0204555, кл. C 12P 13/02, 1987.

(71) Заявитель:
Нитто Кемикал Индастриз Ко., Лтд. (JP),
Терухико Беппу (JP),
Хидеаки Ямада (JP)
(72) Изобретатель: Терухико Беппу[JP],
Хидеаки Ямада[JP], Тору
Нагасава[JP], Суэхару Хориноуги[JP], Макато
Нисияма[JP]
(73) Патентообладатель:
Нитто Кемикал Индастриз Ко., Лтд. (JP),
Терухико Беппу (JP),
Хидеаки Ямада (JP)

(54) ФРАГМЕНТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРОТАЗЫ, РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК PPCL 4, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, ШТАММ БАКТЕРИЙ *ESCHERICHIA COLI* - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИПЕПТИДА, ОБЛАДАЮЩЕГО АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ

(57) Реферат:
Изобретение относится к биотехнологии и генетической инженерии, в частности к получению ферментов клетчаточного метаболизма. Сущность изобретения состоит в том, что из *Pseudomonas chlororaphis* B23 получен фрагмент ДНК, который кодирует полипептид, обладающий активностью

нитрилгидратазы и способный гидратировать нитрилы в амиды. Получена рекомбинантная ДНК, содержащая этот ген, и трансформант, образованный путем трансформации штамма *E. coli* этой рекомбинантной ДНК. Изобретение, кроме того, включает способ получения нитрилгидратазы, используя трансформант. 4 с.п. ф-лы, 10 ил.

RU 2 028 380 C1

RU 2 028 380 C1

Изобретение относится к гену, который получен из *Rseudomonas chlororaphis* B23 и который кодирует полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, гидратирующей нитрилы в амиды. Изобретение относится к рекомбинантной ДНК, содержащей ген, и трансформанту, трансформированному этой рекомбинантной ДНК. Изобретение относится, кроме того, к способу получения нитрил гидратазы, используя трансформант, и амидов, используя нитрил гидратазу.

Нитрилгидратаза или нитрилаза известна как фермент, который гидратирует нитрилы в амиды. Микроорганизмы, которые продуцируют нитрил гидратазу, включают те, которые принадлежат роду *Bacillus*, роду *Bacteridium* роду *Micrococcus* и роду *Brevibacterium* (см. JP-B-62-21517/1989, патент США N 4001081), роду *Corynebacterium* и роду *Vocardia* (см. JP-B-56-17918/1989, патент США 4248968), роду *Pseudomonas* (см. JP B-59-37951/1984, патент США 4637982), роду *Rhodococcus*, роду *Arthrobacter* и роду *Microbacterium* (см. JP-A-61-162193/1986, EP-A-0188316) и *Rhodococcus rhodochromous* (см. JP-A-2-470/1990, EP-A-0307928).

Нитрилгидратаза использовалась для гидратации нитрилов в амиды. Конструируются микроорганизмы, содержащие несколько копий рекомбинантной ДНК, кодирующей нитрилгидратазу, с использованием приемов рекомбинантной ДНК. Рекомбинант продуцирует значительные уровни нитрилгидратазы по сравнению с известными приемами.

Предложен ранее ген, полученный из *Rhodococcus* вида N-774 (FERM BP-1936), который также кодирует полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы (JP-A-2-119778/1988). Напротив, в соответствии с настоящим изобретением используют ген, полученный из *Pseudomonas chlororaphis* B23, описанный в патенте США N 4637982 для продуцирования нитрилгидратазы. Выделен ген, кодирующий нитрилгидратазу, вставил ген в соответствующий вектор плазмиды и трансформировал соответствующего хозяина этой рекомбинантной плазмидой, получая таким образом трансформант, продуцирующий нитрилгидратазу.

Изобретение относится к 1) гену, кодирующему полипептид, который обладает активностью нитрилгидратазы и который содержит α -субблок со следующей аминокислотной последовательностью:

MetSerThrSer15	SerThrThrAla10
ProSerThrProG15	GluArgAlaTrpA20
LeuPheGlnValL25	LysSerLysGluL30
IleProGluGlyT35	ValGluGlnLeuT40
GlnLeuMetAlaH45	AspTrpSerProG50
AsnGlyAlaArgV55	ValAlaLysAlaT60
ValAspProGlnP65	ArgAlaLeuLeuL70

LysAspGlyThrA75	AlaCysAlaGlnP80
GlyTyrThrGlyP85	GlnGlyGluTyrL90
ValAlaLeuGluA95	ThrProGlyVal100
SerLeuCysSer110	ThrAsnTrpPro115
LeuGlyLeuPro120	GluTrpTyrLys125
PheGluPheArg130	ArgLeuValArg135
GlyArgThrVal140	ArgGluLeuGly145
GluLeuProSer150	ThrValLeuLys155
TrpAspThrSer160	GluSerArgTyr165
ValLeuProGln170	ProGluGlySer175
HisMetSerGlu180	GlnLeuGlnGln185
ValThrLysAsp190	LeuIleGlyVal195
LeuProArgVal200	

и β -субъединицу со следующей аминокислотной последовательностью:

MetAspGlyPheH5	AspLeuGlyGlyP10
GlnGlyPheGlyL15	ValProHisThrI20
AsnSerLeuSerT25	LysGlnValPheL30
GlnAspTrpGluH35	LeuAlaTyrSerL40
MetPheValGlyV45	AspGlnLeuLysL50
PheSerValAspG55	ValArgHisAlaV60
GluArgLeuAspV65	ArgGlnHisValG70
ThrGlnTyrTyrG75	ArgTyrIleLeuA80
ThrAlaThrLeuL85	ValGluThrGlyV90
IleThrGlnAlaG95	LeuAspGlnAlaI100
GlySerHisPhe105	LeuAlaAsnProI110
HisAlaThrGly115	ProAlaIleThrI20
ArgProProPhe125	ValGlyAspArgI30
ValValArgAsp135	TyrValAlaGlyI40
IleArgMetProI45	TyrValArgGlyI50
HisArgThrSer160	GlnTrpProPheI65
AspAlaIleGly170	GlyAspLeuSerI75
AlaHisGlnProI80	TyrHisValGluI85
ArgValLysAsp190	TrpGlyAspAlaI95

AspAspGlyTyr200 ValValAspLeu205
 Val Phe
 GluSerTyrLeu210 LysAlaProGly215
 Asp Ala
 GlnAlaValAsn220
 Ala

2) гену, описанному в (1),
 кодирующему α - и β -субблоку, содержащему
 кодирующую α -субблок
 последовательностью

15 30 45
 ATGAGTACATCTATTTCCACGACTGCGAC
 ACCTTCGACACCCGGC
 60 75 90
 GAGAGGGCATGGGCCTTGTTCAGTGC
 TCAAGAGCAAGGAACTC
 105 120 135
 ATCCAGAGGGGCTATGTCGAGCAGCTCA
 CTCAATTGATGGCCCAT
 150 165 180
 GACTGGAGCCCGGAGAACGGCGCTCGC
 GTGGTCGCCAAGGCATGG
 195 210 225
 GTCGATCCGCGAGTTCCGGGCGCTGCTGC
 TCAAGGACGGGAACGCC
 240 255 270
 GCTTGCGCGCAGTTCCGGCTACACCGGCC
 CACAAGGGCAATACATC
 285 300 315
 GTCGCCCTGGAAGATACACCGGGGGTGA
 AGAAGCTCATCGTCTGC
 330 345 360
 AGCCTGTGCTCCTGCACCAACTGGCCGG
 TCCTCGGCCTGCCGCC
 375 390 405
 GAGTGGTACAAGGGCTTTGAGTTTCGTG
 CGCGCCTGGTCCGGGAG
 420 435 450
 GGGCGCACCGTACTGCGCGAGCTGGGG
 ACGGAGTTGCCAGCGAC
 465 480 495
 ACGGTCATCAAAGTCTGGGATACACGCG
 CCGAAAGCCGTTACCTG
 510 525 540
 GTGTTGCCGCAAAGGCCTGAAGGCTCTG
 AGCACATGAGTGAAGAA
 555 570 585
 CAGCTTCAACAGCTGGTGACCAAAGACG
 TGCTGATTGGCGTCGCC
 600
 CTGCCACGCGTTGGC
 и последовательность,
 кодирующую β -субъединицу:

15 30 45
 ATGGATGGCTTTACGATCTCGGCGGTTT
 CCAAGGCTTTGGCAAA
 65 75 90
 GTGCCGCACACCATCAACAGCCTCAGCT
 ACAAAACAGGTTTTCAAG
 105 120 135
 CAGGACTGGGAACACCTGGCCTATAGCT
 TGATGTTTGTGCGGCGTT
 150 165 180
 GACCAATTGAAAAAGTTCAGCGTGGACGA
 AGTGCGTCATGCCGTC
 195 210 225
 GAACGCCTGGACGTTCCGCCAGCATGTGCG
 GCACCCAGTACTACGAA
 240 255 270
 CGCTACATCATCGCGACCGCCACGCTGC
 TGGTGGAACGGGCGTT
 285 300 315
 ATCACCCAGGCGGAGCTCGATCAGGCAT
 TGGGTTCCCACTTCAAG

330 345 360
 CTGGCGAACCCCGCCCATGCGACAGGTC
 GCCCGGCGATCACCGGC
 375 390 405
 AGGCCGCCCCTTCAAGTGGGCGATCGGG
 5 TTGTGGTTCGAGACGAA
 420 435 450
 TATGTGGCGGGGCATATCCGCATGCCGG
 CCTACGTGCGCGGTAAG
 465 480 495
 GAAGGCGTGGTCTGACCCGACCTCAG
 10 AGCAGTGGCCCTTCCCC
 510 525 540
 GACGCCATTGGCCACGGCGACTTGAGCG
 CAGCCCATCAGCCTACC
 555 570 585
 TACCACGTCGAGTTTCGCGTGAAAGATCT
 15 ATGGGGTGACGCGGCA
 600 615 630
 GATGACGGTTACGTCGTGGTTCGATCTTTT
 CGAAAGCTACTTGGAT
 645 660
 20 AAGGCCCCCGGTGCCCAAGCGGTGAACG
 CA

3) рекомбинантной ДНК, содержащей
 вектор, включающий ген, описанный в [1] или
 [2]; 4) трансформанту, трансформированному
 рекомбинантной ДНК, описанной в [3]; 5)
 25 способу продуцирования нитрилгидратазы,
 который содержит культивирование
 трансформанта, и выделение
 нитрилгидратазы из культуры; 6) способу
 продуцирования амидов, который содержит
 гидратирование нитрилов, используя
 30 нитрилгидратазу, с целью получения амидов;
 7) способу получения амидов, который
 содержит культивирование трансформанта и
 гидратирование нитрилов, используя
 полученную в результате культуру
 35 изолированных бактериальных клеток,
 обработанных им, или фиксированным их
 материалом, чтобы получить амиды.

Изоляция и очистка нитрилгидратазы и
 частичный анализ последовательности
 аминокислот нитрилгидратазы.

40 Нитрилгидратазу изолируют и подвергают
 очистке из *Pseudomonas chlororaphis* B 23 и
 разделяют между α и β субблоками,
 используя ЖХВД (жидкостную хроматографию
 под высоким давлением). Определяют часть
 45 аминокислотной последовательности
 субблоками (фиг.1).

Получение ДНК-зонда для гена
 нитрилгидратазы.

ДНК-зонд получают из штамма J M105/py
 V K121 (FERM BP-1937), как это описано в
 50 JP-A-2-119778/1990, благодаря высокой
 степени гомологичности в аминокислотной
 последовательности между β -субблоком
 нитрилгидратазы *Rhodococcus* вида N-744,
 описанным в вышеупомянутой Японской
 Государственной Патентной Газете, и
 55 соответствующим β -субблоком *Pseudomonas*
chlororaphis B23. Плазмиду PyVK121,
 содержащую ген нитрилгидратазы,
 полученный из *Rhodococcus* вида N-744,
 приготавливают из культуры JM105/pyVK121,
 ДНК pyVK121 переваривают при помощи
 60 ферментов Sph I и Sal I. Фрагмент Sph I-Sal
 I содержит ген нитрилгидратазы (фиг. 2-5)
Rhodococcus вида N-744. ДНК-фрагмент
 метят радиоизотопом, чтобы получить зонд.

Обнаружение ДНК-сегмента, содержащего
 ген нитрилгидратазы из хромосомы
Pseudomonas chlororaphis B 23.

Хромосомную ДНК получают из культуры *Pseudomonas chlororaphis* B23. Хромосомную ДНК переваривают ферментами рестрикции и подвергают гибридизации с зондом, описанным в [2], используя процедуру гибридизации Саутерна (Саутерн, Э.М., J Mol. Biol., т.98, с. 503 (1975)). Просеивают два ДНК-фрагмента различной длины.

Конструкция рекомбинантной плазмиды. Рекомбинантную плазмиду конструируют при помощи вставки фрагмента хромосомной ДНК, полученной в [3], в вектор плазмиды.

Трансформация и просеивание трансформанта, содержащего рекомбинантную плазмиду. Трансформанты получают с использованием известной рекомбинантной плазмиды. Трансформант, содержащий рекомбинантную плазмиду, подвергают селекции с использованием зонда, описанного в [2], в соответствии с процедурой гибридизации колоний (Р.Брюс Уоллес и др. NUC/ Ac. Res., т.9, с.879 (1981)). Кроме того, присутствие гена нитрилгидратазы в рекомбинантной плазмиде подтверждают при помощи процедуры гибридизации Саутерна. Отобранные таким образом плазмиды обозначают рPCN1 и рPCN3.

6) Изоляция и очистка ДНК-плазмиды, и конструкция карты рестрикции. ДНК плазмид рPCN1 и рPCN3, изолируют и подвергают очистке. Конструируют карту рестрикции ДНК (фиг.6), чтобы определить область, содержащую ген нитрилгидратазы.

7) Анализ ДНК-последовательности. Дополнительный сегмент вставленного ДНК-фрагмента в рPCN1 и рPCN3 расщепляют с использованием соответствующего фермента рестрикции. Вставленный ДНК-фрагмент затем используют для анализа последовательности. Нуклеотидная последовательность ДНК-фрагмента (фиг.7-10) показывает, что она содержит последовательность, полученную из аминокислотной последовательности, как это описано в (1).

8) Вставка ДНК-фрагмента в вектор экспрессии и трансформация. ДНК-фрагмент отсекают от рPCN1 и рPCN3, используют соответствующие ферменты рестрикции. Эти два фрагмента подвергают лигации и вставляют в вектор экспрессии pVC19. Эту конструкцию используют для трансформации *E.coli* JM105 (Амершэм) и этот трансформант обозначают через JM105/pPCN4.

9) Продуцирование нитрилгидратазы с использованием трансформанта и превращение нитрилов в амиды. Культивируют трансформант, описанный в (8). Бактериальные клетки смешивают с нитрилами, субстратом нитрилгидратазы и получают амиды.

Pseudomonas chlororaphis B23 сдан на хранение в Исследовательский институт ферментации. Агенство по промышленной науке и технологии, и ему присвоен шифр хранения FERM BP-187. Трансформант JM105/pPCN4 сдан на хранение в тот же институт и ему присвоен шифр хранения FERM BR-2779.

Любой вектор, включающий вектор плазмиды (например, pAT 153, pMP9, pHCB24, pKC7, и т.д.), вектор фага (например, λ gt II (Тоинобо), Чарон 4А (Амершэм) и т.д.) можно использовать в соответствии с настоящим

изобретением. Ферменты, которые можно при этом использовать включают Sph I, Sal I, Sac, Bam, Hl, EcoRI, Pst I и т.д., которые производятся промышленностью (фирма Такара Шузо). Самых разнообразных хозяев можно использовать для трансформации, например, *E.coli*, JM105 и TGI (но ими не исчерпывается весь список). Культурной средой для трансформанта может быть любая среда, которую в общем случае используют для этих целей.

Превращение нитрилов в амиды осуществляют с использованием нитрилгидратазы, неочищенной нитрилгидратазы, культуры трансформанта, изолированных бактериальных клеток или их обработанного материала и т.п., полученных из культуры трансформанта.

Соответствующие нитрилы настоящего изобретения включают те, которые содержат 2-4 атома углерода, также, как ацетонитрил, пропионитрил, акрилонитрил, метакрилонитрил, н-бутиронитрил и изобутилонитрил, причем акрилонитрил является предпочтительным.

На фиг.1 показана N-терминальная аминокислотная последовательность α - и β -субблоков нитрилгидратазы, полученной с использованием *Pseudomonas chlororaphis* B23; на фиг.2-5 - ДНК-последовательность гена нитрилгидратазы *Rhodococcus* вида N-774, использованная в качестве ДН-зонда; на фиг.6 - частичные карты рестрикции рекомбинантных плазмид, рPCN1, рPCN3 и рPCN4; на фиг. 7-10 - нуклеотидная последовательность ДНК-вставки в рPCN3, полученная из B23, и выделенная аминокислотная последовательность.

В соответствии с настоящим изобретением предлагается аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность α - и β -субблоков нитрил-гидратазы, получены из *Pseudomonas chlororaphis* B23. Ген, кодирующий нитрилгидратазу, вставляют в вектор экспрессии, а рекомбинантный вектор используют для трансформации. Трансформант содержит несколько копий гена и продуцирует более высокие концентрации нитрилгидратазы по сравнению с известными, используемыми для этих целей, микроорганизмами.

Изобретение описано подробно в приводном ниже примере. В этом примере используют следующие сокращения.

ТЕ: трис-HCl (10 мМ, pH 7,8), ЭДТК (1 мМ, pH 8,0)

TNE: трис-HCl (50 мМ, pH 8,0), ЭДТК (1 мМ, pH 8,0), NaCl (50 мМ)

ТЕ: трис-HCl (50 мМ, pH 8,0), ЭДТК (5 мМ, pH 8,0), сахароза (35 мМ)

Среда 2 ХУТ: 1,6% Триптон, 1,0% экстракт дрожжей, 0,5% NaCl

1. Изоляция и очистка нитрилгидратазы и анализ аминокислотной последовательности части нитрилгидратазы *Pseudomonas chlororaphis* B23 культивировали в среде (10 г/л сахарозы, 4 г/л метакриламида, 0,5 г/л KH_2PO_4 , 0,5 г/л K_2HPO_4 , 0,5 г/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,01 г/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7,0) при 25°C в течение 28 ч. Бактериальные клетки собирали. 100 г бактериальных клеток разрушали и фракционировали при помощи сульфата аммония. Пробу подвергали диализу и диализат подвергали

центрифугированию. Верхний слой удаляли и загружали на хроматографическую колонну ДЕАЕ-Сефадзел, Октил-Сефароза КЛ-4Б, Фенил-Сефароза КЛ-4Б и Сефадекс-Г-150. Активные фракции собирали и подвергали диализу. Диализат, содержащий фермент, загружали на колонну высокоэффективной жидкостной хроматографии, используя обращенно-фазовую колонну (Сеншу Цак ВР-304-1251, Сеншу Кагаку) и получали два субблока (α и β), N-терминальную аминокислотную последовательность α - и β -субблоков определяли с использованием анализатора аминокислотных последовательностей (фирмы Апплайд Биосистемз, Модели 470А), N-терминальные аминокислотные последовательности α - и β -субблоков приведены на фиг.1.

2. Получение ДНК-зонда для гена нитрилгидратазы E.coli JM105, содержащую рУVK121 (FERM BP-1927), культивировали в 100 мл среды 2 x УТ, содержащей 50 μ г/мл ампициллина, при 30°C в течение ночи (12 ч). Бактериальные клетки собирали и в клетки добавляли TNE. Суспензию клеток затем подвергали центрифугированию. В таблетку добавляли 8 мл STE и 10 мг лизоцима. Смесь инкубировали при 0°C в течение 5 мин, затем добавляли 4 мл 0,25 М ЭДТК. Далее, добавляли в смесь при комнатной температуре 2 мл 10% ДСН (додecil сульфата натрия пер.) и 5 мл 5М NaCl. Полученную в результате смесь выдерживали при 0-4°C в течение 3 ч, а затем подвергали ультрацентрифугированию. В верхний слой добавляли 1/2 объема 30% ПЕГ 6000. Смесь выдерживали при 0-4°C в течение ночи (12 ч) и подвергали центрифугированию. В таблетку добавляли TNE, чтобы получить объем 7,5 мл, а затем в суспензию добавляли CSCI. Смесь подвергали центрифугированию, чтобы удалить протеины. Далее в верхний слой добавляли 300-500 мг/мл бромида этидия. Смесь переносили в пробирку для центрифугирования. Пробирку запаивали, а затем подвергали ультрацентрифугированию, ДНК экстрагировали, используя перистальтический насос. В экстракт, чтобы удалить бромид этидия, добавляли несколько больше, чем равное количество изопропилового спирта, насыщенного водой. Пробу подвергали диализу против TE. Получали примерно 3 мл очищенной рУVK121.

рУVK121 ДНК переваривали ферментами Sph I и Sal I, получая в результате ДНК-фрагмент в 2,07 ко (килооснования - пер.), содержащий ген нитрилгидратазы, полученный и R.rodosoccus вида N-774. Фрагмент метили радионуклидом 32 P, чтобы получить зонд. Нуклеотидная последовательность зонда приведена на фиг.2-5.

3. Получение ДНК-фрагмента, содержащего ген нитрилгидратазы хромосомы. Pseudomonas chlororaphis B23 культивировали в 100 мл среды, описанной [1]. Бактериальные клетки собирали и таблетку промывали при помощи TNE. Затем таблетку суспендировали в 10 мл TE. В суспензию добавляли 4 мл 0,25М ЭДТК, 10-20 мг лизоцима, 10-20 мл ахромопротеазы и 10 мл 10% ДСН. Суспензию инкубировали при 37 °C в течение 3 ч. В суспензию добавляли

15 мл фенола. Смесь инкубировали при комнатной температуре 60°C в течение 15 мин, а затем центрифугировали. В 15 мл верхнего слоя добавляли 0,7 мл 2,5М ацетата натрия и диэтиловый простой эфир, смесь центрифугировали.

Верхний слой сбрасывали. В нижний слой добавляли два объема этанола и ДНК удаляли стеклянным стержнем. ДНК промывали в течение 5 мин при помощи смеси TE : этанол 2:8, 1:9 и 0:10 (о/о). ДНК затем снова суспендировали в 2-4 мл TE (37°C). 10 μ л смеси РНазы А и T₁ добавляли в суспензию смесь

инкубировали при 37°C. В смесь добавляли равное количество фенола, а затем подвергали центрифугированию. В 2-4 мл верхнего слоя добавляли больше, чем равное количество простого эфира. Смесь подвергали центрифугированию. После центрифугирования верхний слой сбрасывали. Нижний слой подвергали диализу относительно 2 л TE, содержащего небольшое количество хлороформа, в течение ночи, а затем диализу относительно свежего TE в течение 3-4 чл. Получали 4 мл неочищенной хромосомной ДНК. Переваривание ферментом хромосомной ДНК осуществляли следующим образом:

а) 2 μ л Sac I + 3 μ л реакционного буфера (10x) + 15 л хромосомной ДНК + 10 μ л TE

в) 2 μ л Bam HI + 2 μ л Sal I + 3 μ л реакционного буфера (10x) + 15 μ л хромосомной ДНК + 10 μ л TE.

Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч, а затем подвергали электрофорезу на геле агарозы при разности потенциалов 60 В в течение 3 ч. Гибридизацию Саутерна хромосомной ДНК осуществляли с использованием зонда, описанного в (2). Обнаруживали фрагменты в примерно 4,6 ко и 4,7 ко, что говорит о сильной гибридизации. 15 μ л хромосомной ДНК переваривали при помощи Sac I Bam HI и Sal I и подвергали электрофорезу на геле агарозы, как это было описано выше. ДНК-фрагменты в 4,6 ко и 4,7 ко срезали с геля и переносили в три объема 8М NaClO₄. Раствор наносили каплями на фильтровальную бумагу GF/C/Batman/ (диаметр 6 мм). На фильтровальную бумагу добавляли десять капель (\approx 100 μ л) TE, содержащего 6М NaClO₄, и десять капель (\approx 100 μ л) 95% этанола. Затем бумагу сушили воздухом и помещали в 0,5 мл пробирку Эппендорфа. В пробирку добавляли 40 μ л TE и все это инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Затем пробирку центрифугировали. Получали примерно 40 μ л верхнего слоя, который содержал ДНК-фрагменты в 4,6 ко и 4,7 ко, содержащие ген нитрилгидратазы хромосомной ДНК.

4. Вставка хромосомного ДНК-фрагмента в вектор.

а) ДНК-фрагмента 4,6 ко

2 μ л Sac I, 3 μ л реакционного буфера (10x) и 10 мл TE добавляли в 10 μ л ДНК рVC18. Смесь инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. 2 μ л 0,25М ЭДТК добавляли в смесь, чтобы прекратить реакцию. Затем в смесь добавляли 7 μ л ТМ Трис-HCl (pH 9) и 3 μ л БДФ (бактериальной щелочной фосфатазы). Смесь инкубировали

при 65°C в течение 1 ч. Затем в смесь добавляли ТЕ, чтобы довести общий объем до 100 μ л. Смесь экстрагировали 3х равным количеством фенола. В экстракт добавляли равное количество простого эфира. Нижний слой удаляли и в нижний слой добавляли 10 μ л 3М ацетат натрия и 250 μ л этанола. Смесь инкубировали при -80°C в течение 30 мин, подвергали центрифугированию. Сушили и снова суспендировали в ТЕ.

Полученные таким образом 5 μ л ДНК Р С18 и 40 μ л ДНК-фрагмента в 4,6 ко, описанного в (3), смешивали. В смесь добавляли 6 μ л буфера лигации, 6 μ л АТФ (6 мг/мл) и 3 μ л ДНК Т4-лигазы. Смесь инкубировали при 4°C в течение ночи (12 ч), чтобы получить рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,6 ко в Сайте Sal I в РVC18.

в) ДНК-фрагмент в 4,7 ко рVC18 переваривали при помощи Bam HI и Sal I. ДНК-фрагмент в 4,7 ко вставляли в сайт Bam HI - Sal I в рVC18 точно так же, как это описано в (4а). Получали рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,7 ко в сайте Bam HI - Sal I.

5. Трансформация и просеивание трансформантов.

E. coli JM105 (Амерцэм) прививали на 10 мл среды 2 х УТ и инкубировали при 37°C в течение 12 ч. После инкубирования полученную в результате культуру добавляли в свежую среду 2 х УТ до концентрации 1%, смесь инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Культуру подвергали центрифугированию и таблетку суспендировали в 5 мл холодного 50 мМ CaCl₂. Суспензию помещали в температуру 0°C на 40 мин, а затем подвергали центрифугированию. В таблетку в отдельной пробирке добавляли 0,25 мл холодного 50 мМ CaCl₂ и 60 μ л каждой из рекомбинантных плазмид, полученных в (4а,в). Смесь инкубировали при 0°C в течение 40 мин, подвергали термическому удару до 42°C в течение 2 мин, помещали в температуру 0°C 5 мин и добавляли в 10 мл среды 2 х УТ. Смесь инкубировали при 37°C в течение 90 мин при встряхивании, затем центрифугировали. Таблетку суспендировали в 1 мл среды 2 х УТ и 10 μ л суспензии наносили на агарозную пластинку 2 х УТ, содержащую 50 μ г/мл ампициллина. Пластинку инкубировали при 37°C. Колонию выращивали на пластинке, затем подвергали селекции методом гибридизации колонии: Колонию переносили на нитроцеллюлозные фильтр и переваривали. ДНК фиксировали на фильтре и гибридизировали с зондом, описанным в [2]. Фильтр подвергали автордиографии и отбирали рекомбинантную колонию. Кроме того, присутствие гена нитрилгидратазы в трансформанте подтверждали в соответствии с процедурой гибридизации Саутерна.

6) Изоляция и очистка рекомбинантной плазмиды и конструкция карты рестрикции вставленных ДНК-фрагментов.

Трансформант выращивали в 100 мл среды 2 х УТ, содержащей 50 μ г/мл ампициллина при 37°C в течение ночи (12 ч). Бактериальные клетки собирали и в клетки добавляли TNE. Клетки собирали снова

центрифугированием и в клетки добавляли 8 мл ТЕ и 10 мг лизоцима. Смесь инкубировали при 0°C в течение 5 мин. В смесь добавляли 4 мл 0,25 м ЭДТК, 2 мл 10% ДСН (при комнатной температуре) и 5 мл 5М NaCl.

Смесь инкубировали при 0-4°C в течение 3 ч и подвергали ультрацентрифугированию. В верхний слой добавляли 1/2 объема 30- ПЕН 6000. Смесь инкубировали при 0-4°C в течение ночи (12 ч) и снова центрифугировали. TNE добавляли в таблетку, чтобы довести до объема 7,5 мл. В суспензию добавляли CSCI. Суспензию центрифугировали, чтобы удалить протеины. Далее, в верхний слой добавляли 300-500 мг/мл бромида этидия и смесь переносили в пробирку для центрифугирования. Пробирку запаивали нагреванием и подвергали ультрацентрифугированию. ДНК удаляли, используя перистальтический насос. В ДНК, чтобы удалить бромид этидия, добавляли несколько больше, чем равное количество изопропилового спирта, насыщенного водой. Пробу ДНК подвергали диализу относительно ТЕ, что приводило к образованию примерно 3 мл рекомбинантной ДНК. Полученную таким образом рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,6 ко, переваривали как рPCN1 (Рекомбинантную плазмиду, содержащую ДНК-фрагмент в 4,5 ко, переваривали как рPCN3).

Эти ДНК плазмид переваривали при помощи Eco RI, Bam HI, Pst I, Sac I и Sal I. Карты рестрикции конструировали и они приведены на фиг.6.

7) Анализ ДНК-последовательности.

Расположение гена нитрилгидратазы в ДНК-фрагментах рPCN1 и рPCN3 определяли при помощи карты рестрикции и использованием процедуры гидролиза Саутерна. Основываясь на этих результатах, анализировали ДНК-фрагмент Bam HI - Hinc II при помощи процедуры Сангера (Сангер, Ф., Science, т.214, с. 1205-1210, (1981)), используют вектор фага M13. ДНК-фрагмент в 2456 ко из *Pseudomonas chlororaphis* B23 приведен на фиг.4.

Вся нуклеотидная последовательность, полученная из аминокислотной последовательности, определенной в [1], была обнаружена в последовательности в соответствии с описанием, приведенным выше. Анализ последовательности также обнаруживали, что этот ДНК-фрагмент содержал последовательность, кодирующую α - и β -субблоки.

8) Вставка ДНК-фрагмента Bam HI - Hinc II в вектор экспрессии и трансформации.

Фрагмент Sph I - Bam HI в 2,2 ко в рPCN1 и фрагмент Nam HI - Sal I в 4,7 ко в рPCN3 расщепляли, оба фрагмента подвергали лигации (фиг.3). Фрагмент после лигации вставляли в сайт Sph I - Sal I вектора экспрессии рVC19 и полученную конструкцию обозначали как рPCN4.

E. coli JM105 трансформировали при помощи рPCN4 точно так же, как это делали в (5), и трансформант обозначали через JM105/pPCN4 (FERM BP-2779).

9) Производство нитрилгидратазы, используя трансформант, и превращение нитрилов в амиды, используя нитрилгидратазу.

JM105/pPCN4 прививали в 10 мл среды 2 х УТ, содержащей 50 μ г/мл ампициллина, и

инкубировали при 26,5°C в течение ночи (12 ч). 100 μ л полученной в результате культуры добавляли в 10 мл среды 2 х УТ (50 г/мл ампициллина, 50 мг/л $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 мг/л $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 мг/л пирролохинолинхонона). Эту смесь инкубировали при 26,5°C в течение 5 ч. В смесь добавляли IPTG до финальной концентрации 1 мм. Смесь инкубировали при 26,5°C в течение 10 мин. После сбора клеток клетки суспендировали в 5 мл 1/20 М фосфатного буфера (рН 7,7). В 0,1 мл суспензии добавляли 10 μ л раствора субстрата (1М акрилонитрила). Смесь инкубировали при 20°C в течение 20 мин. В качестве контрольного испытания использовали смесь, полученную при помощи аналогичной процедуры, что была описана выше, но из E.coli JM105. Реакционную смесь испытывали на присутствие акриламида (продукта ферментной реакции) и акрилонитрила, используя ЖХВД. Акриламид, но не акрилонитрил обнаруживали в реакционной смеси JM105 pPCN4, в то время, как акрилонитрил, а не акриламид обнаруживали в реакционной смеси JM105.

Формула изобретения:

ФРАГМЕНТ НУКЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ, КОДИРУЮЩИЙ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДНАЯ ДНК pPCL 4, КОДИРУЮЩАЯ ПОЛИПЕПТИД, ОБЛАДАЮЩИЙ АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ,

ШТАММ БАКТЕРИЙ ESCHERICHIA COLI - ПРОДУЦЕНТ ПОЛИПЕПТИДА, ОБЛАДАЮЩЕГО АКТИВНОСТЬЮ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ НИТРИЛГИДРАТАЗЫ.

5 1. Фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, полученный путем клонирования гена нитрилгидратазы, происходящего из *Pseudomonas chlororaphis*-B23, со следующей нуклеотидной последовательностью, приведенной в описании изобретения.

10 2. Рекombинантная плазмидная ДНК pPCL4, кодирующая полипептид, обладающий активностью нитрилгидратазы, размером 9,574 т.п.о., содержащая Sph1 - Sal1-фрагмент нуклеиновой кислоты, кодирующий полипептид, обладающий свойствами нитрилгидратазы из *Pseudomonas chlororaphis*-B23 размером 6,9 т.п.о., Sal1 - Sph1-фрагмента ДНК вектора pUC19, размером 2.674, т.п.о., уникальные сайты рестрикции: два сайта Sal1, по одному сайту Sph1, Bam H1, Sac1, Bgl1, Hinc11, генетические маркеры Amp^r - ген устойчивости к ампициллину.

15 3. Штамм бактерий *Escherichia coli* FERM BP-2779 - продуцент полипептида, обладающего активностью нитрилгидратазы.

20 4. Способ получения нитрилгидратазы, заключающийся в том, что культивируют штамм бактерий *Escherichia coli* FERM BP-2779 и извлекают нитрилгидратазу из культуральной среды.

35

40

45

50

55

60

LC 083820 RU 2028380 C1

α subunit

α_1 : Ser-Thr-Ser-Ile-Ser-Thr-Thr-Ala-Thr-Pro-Ser-Thr-Pro-Gly-Glu-Arg-Ala-Trp-Ala-Leu-Phe-Gln-Val-Leu-Lys-²³

β subunit

β_1 : Met-Asp-Gly-Phe-His-Asp-Leu-Gly-Gly-Phe-Gln-Gly-Phe-Gly-Lys-Val-Pro-His-Thr-Ile-Asn-Ser-Leu-²⁰

φu2.1

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

Sph I
 GCATGCTTTCCACATCTGGAACGTGATCGCCACGGACGGTGGTG
 CCTACCAGATGTTGGACGGCAACGGATACGGCATGAACGCCGAAG
 GTTTGTACGATCCGGAACTGATGGCACACTTTGCTTCTCGACGCA
 TTCAGCACGCCGACGCTCTGTCCGAAACCGTCAAACCTGGTGGCCC
 TGACCGGCCACACGGCATCACCCACCCCTCGGCGGGCGGAGCTACG
 GCAAAGCCCCGGAACCTCGTACCGCTTGCCCGCGCCGCTACGACA
 CTGCCTTGAGACAATTTCGACGTCCTGGTGATGCCAACGCTGCCCT
 ACGTCGCATCCGAATTGCCGGCGAAGGACGTAGATCGTGCAACCT
 TCATCACCAAGGCTCTCGGGATGATCGCCAACACGGCACCATTCCG
 ACGTGACCGGACATCCGTCCCTGTCCGTTCCGGCCGGCCTGGTGA
 ACGGGGTTCCGGTCGGAATGATGATCACCGGCAGACACTTCGACG
 ATGCGACAGTCCTTCGTGTCCGACGGCGCATTCGAAAAGCTTCGCG
 GCGGGTTTCCGACGCCGCCGAACCGGCCTCCAACCTCTGCACCAC
 AACTCAGCCCCGCCCTAGTCCTGACGCACTGTCAGACAACAATTTC
 CACCGATTCAACATGATCAGCCACATAAGAAAAGGTGAACCAG
 ATGTCAGTAACGATCGACCACACAACGGAGAACGCCCGCACCGGCC
 MetSerValThrIleAspHisThrThrGluAsnAlaAlaProAla
 Subunit α
 CAGGCGGCGGTCTCCGACCGGGCGTGGGCACTGTTCCGCGCACTC
 GlnAlaAlaValSerAspArgAlaTrpAlaLeuPheArgAlaLeu

фиг. 2

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

Kpn I
GACGGTAAGGGATTGGTACCCGACGGTTACGTCGAGGGATGGAAG⁸⁰⁰
AspGlyLysGlyLeuValProAspGlyTyrValGluGlyTrpLys
AAGACCTCCGAGGAGGACTTCAGTCCAAGGCGCGGAGCGGAATTG⁸⁵⁰
LysThrSerGluGluAspPheSerProArgArgGlyAlaGluLeu
GTAGCGCGCGCATGGACCGACCCCGAGTTCCGGCAGCTGCTTCTC^{Pvu II}
ValAlaArgAlaTrpThrAspProGluPheArgGlnLeuLeuLeu
ACC⁰⁰⁰GACGGTACCGCCGCGAGTTGCCAGTACGGATACCTGGGCCCC^{Kpn I}
ThrAspGlyThrAlaAlaValAlaGlnTyrGlyTyrLeuGlyPro
CAGGCGG⁰⁵⁰CTACATCGTGGCAGTCCGAGACACCCCGACACTCAAG
GlnAlaAlaTyrIleValAlaValGluAspThrProThrLeuLys
AACGTGATCGTGTGCTCGCTGTGTTCATGCACCGCGTGGCCCATC¹⁰⁰⁰
AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAlaTrpProIle
CTCGGTCTGCCACCCACCTGGTACAAGAGCTTCGAATACCGTGCG¹⁰⁵⁰
LeuGlyLeuProProThrTrpTyrLysSerPheGluTyrArgAla
CGCGTGGTCCGCGAACCACGGAAGGTTCTCTCCGAGATGGGAACC¹¹⁰⁰
ArgValValArgGluProArgLysValLeuSerGluMetGlyThr
GAGATCGCGTCGGACATCGAGATTGCGGTCTACGACACCACCGCC¹¹⁵⁰
GluIleAlaSerAspIleGluIleArgValTyrAspThrThrAla
GAAACTCGCTACATGGTCTCTCCCGCAGCGTCCCGCCGGCACCGAA¹²⁰⁰
GluThrArgTyrMetValLeuProGlnArgProAlaGlyThrGlu
GGCTGGAGCCAGGAACAACTGCAGGAAATCGTCACCAAGGACTGC^{Pst I}
GlyTrpSerGlnGluGlnLeuGlnGluIleValThrLysAspCys¹²⁵⁰
CTGATCGGGGTGCAATCCCGCAGGTTCCCAACCGTCTGATCACCC¹³⁰⁰
LeuIleGlyValAlaIleProGlnValProThrValTRM
CGACAAGAAGGAAGCACACC-ATGGATGGAGTACACGATCTTGCC
MetAspGlyValHisAspLeuAla
Subunit β
phi2.3

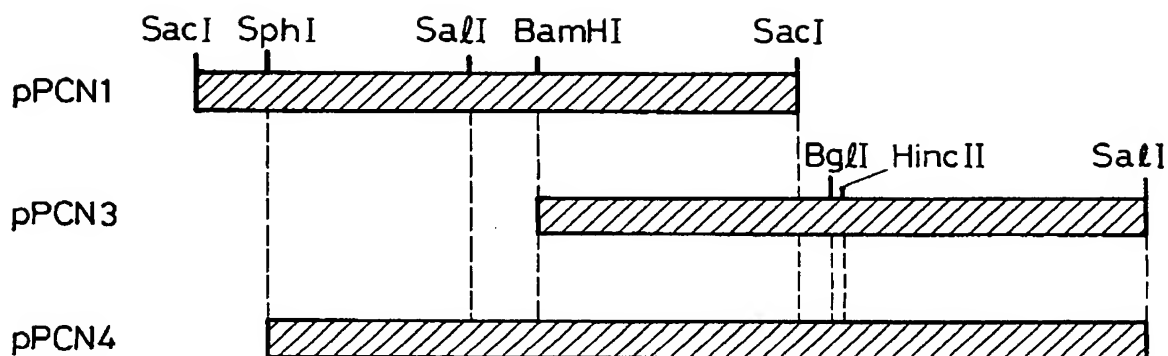
RU 2028380 C1

¹³⁵⁰
GGAGTACAAGGCTTCGGCAAAGTCCCGCATACCGTCAACGCCGAC
GlyValGlnGlyPheGlyLysValProHisThrValAsnAlaAsp
¹⁴⁰⁰
ATCGGCCCCACCTTTTCACGCCGAATGGGAACACCTGCCCTACAGC
IleGlyProThrPheHisAlaGluTrpGluHisLeuProTyrSer
¹⁴⁵⁰ ^{Sal I}
CTGATGTTCCGGGTGTCCGCGAAGTCCGGGCTTCAGCGTCGAC
LeuMetPheAlaGlyValAlaGluLeuGlyAlaPheSerValAsp
¹⁵⁰⁰
GAAGTGGCATAACGTCGTCCGAGCGGATGGAGCCGGGCCACTACATG
GluValArgTyrValValGluArgMetGluProGlyHisTyrMet
¹⁵⁵⁰
ATGACCCCGTACTACGAGAGGTACGTCATCGGTGTCCGACATTG
MetThrProTyrTyrGluArgTyrValIleGlyValAlaThrLeu
¹⁶⁰⁰
ATGGTCGAAAAGGGAATCCTGACGCAGGACGAAGTCCGAAAGCCTT
MetValGluLysGlyIleLeuThrGlnAspGluLeuGluSerLeu
¹⁶⁵⁰
CGGGGGGACCGTTCCCACTGTCACGGCCCAGCGAATCCGAAGGG
AlaGlyGlyProPheProLeuSerArgProSerGluSerGluGly
¹⁷⁰⁰
CGGCCGGCACCCGTCGAGACGACCACTTCGAAGTCCGGGCAGCGA
ArgProAlaProValGluThrThrThrPheGluValGlyGlnArg
¹⁷⁵⁰
GTACGCGTACGCGACGAGTACGTTCCGGGGCATATTCGAATGCCT
ValArgValArgAspGluTyrValProGlyHisIleArgMetPro
GCATACTGCCGTGGACGAGTGGGAACCATCTCTCATCGAACTACC
AlaTyrCysArgGlyArgValGlyThrIleSerHisArgThrThr
¹⁸⁰⁰
GAGAAGTGGCCGTTTCCCGACGCAATCGGCCACGGGCGCAACGAC
GluLysTrpProPheProAspAlaIleGlyHisGlyArgAsnAsp
¹⁸⁵⁰
GCCGGCGAAGAACCGACGTACCACGTGAAGTTCGCCGCCGAGGAA
AlaGlyGluGluProThrTyrHisValLysPheAlaAlaGluGlu
¹⁹⁰⁰ ^{Sal I}
TTGTTCCGTAGCGACACCGACGGTGGAAAGCGTCGTTGTGACCTC
LeuPheGlySerAspThrAspGlyGlySerValValValAspLeu

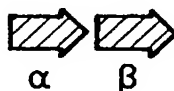
φu2.4

¹⁹⁵⁰
TTCGAGGGTTACCTCGAGCCTGCGGCCTGATCTTCCAGCATTCCA
PheGluGlyTyrLeuGluProAlaAlaTRM
²⁰⁰⁰
GGCGGGCGGTACGCGATCACAGCGGTTCGTGCGACCGCCGCCCTGA
TCACCACGATTCACTCATTCCGAAGGACACTGGAAATCATGGTCC
²⁰⁵⁰
Sal I
AC

φu2.5



φu2.6



10 20 30 40 50 60
 GGATCCCGTCTGGCCTTCTGCGGTACCTACGGCATGAAGCCCACCCACGGCCTGGTGCCCT
 70 80 90 100 110 120
 ACACCGGCGTCATGGCGATTGAAGCCACGATCGATCATGTCTGGCCCCATCACCGGTAACG
 130 140 150 160 170 180
 TCGCGGACAAACGCGCTGATGCTGCAGGCAATGGCCGGTGCAGACGGACTCGACCCGCGCC
 190 200 210 220 230 240
 AGGCGGCGCCTCAGGTCGATGACTATTGCAGTTACCTGGAAAAAGGCGTGAGCGGACTCA
 250 260 270 280 290 300
 GAATCGGGGTGTTGCAAGAGGGATTTCGCGCTTGCTAACCAGGACCCTCGCGTGGCGGACA
 310 320 330 340 350 360
 AAGTGGCGGACGCCATCGCCCGACTCGAGGCGTTGGGCGCTCATGTCTGAGCCGGTCTCCA
 370 380 390 400 410 420
 TTCCCGAGCACAACCTGGCAGGGTTGTTGTGGACCCCATCGGTTGCGAAGGCTTGACCA
 430 440 450 460 470 480
 TGCAGATGATGCATGGCAACGGCGCAGGCTTTAACTGGAAAGGACTTTACGATGTCTGGCC
 490 500 510 520 530 540
 TGCTGGACAAACAAGCCAGCTGGCGCGACGACGCAGACCAATTATCCGCGTCTGCTCAAGC
 550 560 570 580 590 600
 TCTGCATGTTCTGTCGGCCAAATACGGCCTGTCTGGCTACAACGGACGCTACTACGCCAAGG
 610 620 630 640 650 660
 CCCAGAACCTTGACGCTTTGCCCCGCGAGGGATACGACAAAGCGCTGCAAACCTATGACC
 670 680 690 700 710 720
 TGCTGGTGATGCCGACCACGCCCATCACGGCCCAACCCACCCGCGCAGCGAACTGCTCGA

φu2.7

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

730 740 750 760 770 780
 TCACGGAGTACGTGGCTCGCGCGTTGGAAATGATCGGCAATACCGCGCCACAGGACATCA
 790 800 810 820 830 840
 CCGGGCATCCGGCCATGTCGATTCCGTGTGGCCTGCTGGACGGCCTGCCCGTCCGGGCTGA
 850 860 870 880 890 900
 TGCTGGTCCGAAAACTACGCCGAGGGCAGGATTTACCAAGCGGCGGCGGCGTTTGAAG
 910 920 930 940 950 960
 CCTCGGTGGACTGGCGCACGCTCTGAGCCTTTTACAGGCGCGCCCCCCCCCTGAAGAACGA
 970 980 990 1000 1010 1020
 TAAGAAAGACCGGCAAGTTGCAATGACTTTTCAACCGCGTTGACTGATAGGAGTTACCCC
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 ATGAGTACATCTATTTCCACGACTGGGACACCTTCGACACCCGGCGAGAGGGGCATGGGCC
 MetSerThrSerIleSerThrThrAlaThrProSerThrProGlyGluArgAlaTrpAla
 Subunit α
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 TTGTTTCAAGTGCTCAAGAGCAAGGAACTCATCCAGAGGGCTATGTCCGAGCAGCTCACT
 LeuPheGlnValLeuLysSerLysGluLeuIleProGluGlyTyrValGluGlnLeuThr
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 CAATTGATGGCCCATGACTGGAGCCCGGAGAACGGCGCTCGCGTGGTCCGCCAAGGCATGG
 GlnLeuMetAlaHisAspTrpSerProGluAsnGlyAlaArgValValAlaLysAlaTrp
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 GTCGATCCGCAGTTCCGGGCGCTGCTGCTCAAGGACGGAACAGCCGCTTGGCGGCAGTTC
 ValAspProGlnPheArgAlaLeuLeuLeuLysAspGlyThrAlaAlaCysAlaGlnPhe
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 GGCTACACCGGCCCACAAGGCGAATACATCGTCGCCCTGGAAGATACACCGGGGGTGAAG
 GlyTyrThrGlyProGlnGlyGluTyrIleValAlaLeuGluAspThrProGlyValLys
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 AACGTCATCGTCTGCAGCCTGTGCTCCTGCACCAACTGGCCGGTCTCTGGGCCCTGCCGCC
 AsnValIleValCysSerLeuCysSerCysThrAsnTrpProValLeuGlyLeuProPro
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GAGTGGTACAAGGGCTTTGAGTTTCGTGCGCGCCTGGTCCGGGAGGGGCGCACCGTACTG
 GluTrpTyrLysGlyPheGluPheArgAlaArgLeuValArgGluGlyArgThrValLeu

φuz.8

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

RU 2028380 C1

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 CGCGAGCTGGGGACGGAGTTGCCGAGCGACACGGTCATCAAAGTCTGGGATACCAGCGCC
 ArgGluLeuGlyThrGluLeuProSerAspThrValIleLysValTrpAspThrSerAla
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 GAAAGCCGTTACCTGGTGTGGCCGAAAGGCCTGAAGGCTCTGAGCACATGAGTGAAGAA
 GluSerArgTyrLeuValLeuProGlnArgProGluGlySerGluHisMetSerGluGlu
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 CAGCTTCAACAGCTGGTGACCAAAGACGTGCTGATTGGCGTCGCCCTGCCACGCGTTGGC
 GlnLeuGlnGlnLeuValThrLysAspValLeuIleGlyValAlaLeuProArgValGly
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TGAGAAAAACAACATCATCGTTCAACTTGCGGAGTTTTCATTATGGATGGCTTTCAC
 MetAspGlyPheHis
 Subunit β

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 GATCTCGGCGGTTTCCAAGGCTTTGGCAAAGTGCCGCACACCATCAACAGCCTCAGCTAC
 AspLeuGlyGlyPheGlnGlyPheGlyLysValProHisThrIleAsnSerLeuSerTyr
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 AAACAGGTTTTCAAGCAGGACTGGGAACACCTGGCCTATAGCTTGATGTTTGTGCGCGTT
 LysGlnValPheLysGlnAspTrpGluHisLeuAlaTyrSerLeuMetPheValGlyVal
 1810 1820 1830 1840 1850 1860
 GACCAATTGAAAAAGTTCAGCGTGGACGAAGTGCATGCCGTCGAACGCCTGGACGTT
 AspGlnLeuLysLysPheSerValAspGluValArgHisAlaValGluArgLeuAspVal
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 CGCCAGCATGTCCGGACCCAGTACTACGAACGCTACATCATCGCGACCGCCACGCTGCTG
 ArgGlnHisValGlyThrGlnTyrTyrGluArgTyrIleIleAlaThrAlaThrLeuLeu
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 GTGGAACCGGCGTTATCACCAGGCGGAGCTCGATCAGGCATTGGGTTCCCACTTCAAG
 ValGluThrGlyValIleThrGlnAlaGluLeuAspGlnAlaLeuGlySerHisPheLys
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 CTGGCGAACCCCGCCCATGCGACAGGTGCGCCGCGGATCACCAGGCGGCGCCCTTCGAA
 LeuAlaAsnProAlaHisAlaThrGlyArgProAlaIleThrGlyArgProProPheGlu
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 GTGGGCGATCGGGTTGTGGTTCGAGACGAATATGTGGCGGGCATATCCGCATGCCGGCC
 ValGlyAspArgValValValArgAspGluTyrValAlaGlyHisIleArgMetProAla
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 TACGTGCGCGGTAAGGAAGGCGTGGTCTGCACCGCACCTCAGAGCAGTGGCCCTTCCCC
 TyrValArgGlyLysGluGlyValValLeuHisArgThrSerGluGlnTrpProPhePro

φu2.9

2170 2180 2190 2200 2210 2220
 GACGCCATTGGCCACGGCGCACTTGAGCGCAGCCCATCAGCCTACCTACCACGTCGAGTTT
 AspAlaIleGlyHisGlyAspLeuSerAlaAlaHisGlnProThrTyrHisValGluPhe
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 CGCGTGAAAGATCTATGGGCTGACGCGGCAGATGACGGTTACGTCGTGGTTCGATCTTTTC
 ArgValLysAspLeuTrpGlyAspAlaAlaAspAspGlyTyrValValValAspLeuPhe
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 GAAAGCTACTTGGATAAGGCCCCCGGTGCCCAACCGGTGAACGCATGATTGAAGGCGCCC
 GluSerTyrLeuAspLysAlaProGlyAlaGlnAlaValAsnAla
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 AGGCGGGCCGACTGCCGGTGACGGTCCTTCCGGCTTCCTCGGCGCCGGCAAAACCACCC

2410 2420 2430 2440 2450
 TGCTCAACGCTATCCTGCGAAATCGCCAAGGACTGCGGGTCGCGGTCACTCGTCAAC

φu2.10

RU 2028380 C1